



TITLE:

# Photochemical Reaction Product of Hydroxyethylthiamine with $\alpha$ -Lipoic Acid( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Oishi, Nobuko

---

CITATION:

Oishi, Nobuko. Photochemical Reaction Product of Hydroxyethylthiamine with  $\alpha$ -Lipoic Acid. 京都大学, 1967, 理学博士

ISSUE DATE:

1967-03-23

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/212180>

RIGHT:

氏 名	大 石 誠 子
学位の種類	大 石 誠 子 お お い し のぶ こ 理 学 博 士
学位記番号	論 理 博 第178号
学位授与の日付	昭 和 42 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	<b>Photochemical Reaction Product of Hydroxyethylthiamine with <math>\alpha</math>-Lipoic Acid</b> (ヒドロキシエチルチアミンとリポ酸の光化学反応生成物に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 田 中 正 三 教 授 藤 永 太 一 郎 教 授 波 多 野 博 行

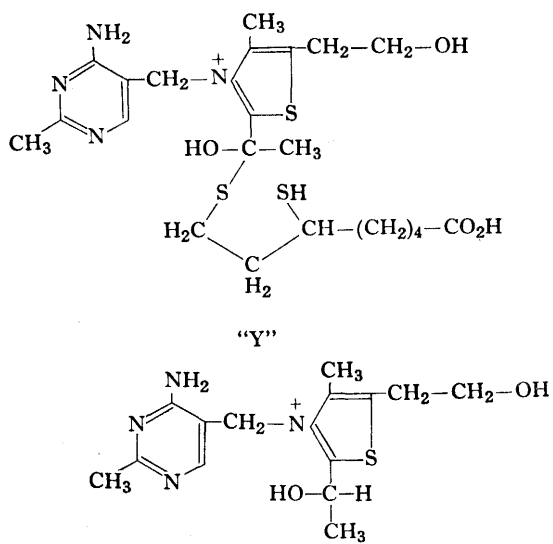
### 論 文 内 容 の 要 旨

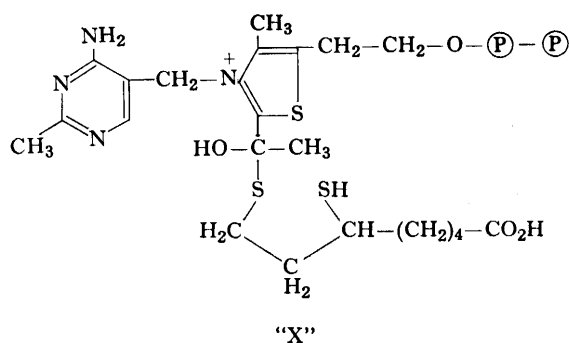
含水炭素や脂肪酸が生体内で酸化分解されて、生命を支えるに必要なエネルギーを生ずる生化学的変化は、今世紀のはじめ頃から数多くの生化学者によって研究され、その中から多数のノーベル賞受賞者が輩出している生化学での最も重要な研究課題である。

この過程の中で、ピルビン酸や  $\alpha$ -ケトグルタル酸が酸化的に脱炭酸されて対応するアシル基供与体を生ずる段階は、チアミンピロリン酸 (TPP), リポ酸 (LiA), FAD, NAD および CoA を補酵素とする多数の酵素よりなる複合酵素系によって触媒されていることが知られているが、この変化における補酵素類の役割や補酵素と基質との間に生成する中間生成物については、なお推定の域を出ないところが残されている。Reed らによると、ピルビン酸の酸化的脱炭酸過程は図 I に示すようであり、ピルビン酸は TPP を補酵素とする Pyruvate decarboxylase によって脱炭酸され、生成した活性アセトアルデヒドは TPP と結合して2-ヒドロキシエチルチアミンピロリン酸 (HETPP) となり、ヒドロキシエチル基は、Lipoic Acid reductase-transacetylase によって HETPP よりリポ酸へ、さらに、CoA へと転移する間に脱水素されてアセチル-CoA となるとされている。図 I において、中間体の HETPP やアセチル-CoA の化学構造については既に確証されているが、“X”については Ingraham らによって図 II に示した中間体の存在が推定されているだけで、これを証明する実験的証拠は未だあげられていない。

申請者の主論文は、ヒドロキシチアミンと  $\alpha$ -リポ酸との混合溶液に紫外線照射を行なって、図 II の“X”からピロリン酸を失なった構造を有すると推定される新化合物“Y”の合成に成功し、さらに、これを基質として、ブタの心筋または大腸菌から抽出精製したピルビン酸酸化酵素系を用いて、このピロリン酸エステルが“X”であることを証明したものである。

実験には、まず、チアミンとアセトアルデヒドとより Miller の方法によって調製したヒドロキシエチルチアミン (HET) と市販の  $\alpha$ -リポ酸とを、微量の塩酸を含む50%エタノールに溶解し、冷却しながら特性波長 2537Å の紫外線殺菌灯または低圧水銀ランプを用いて5時間照射し、生成物を濾紙クロマトグ





ラフィーならびに滬紙電気泳動法によって処理し、原料の HET,  $\alpha$ -リボ酸 HET の分解で生ずるチアミン、副生する  $\beta$ -リボ酸などから分離した。精製した新化合物は白色粉末で  $192^{\circ}\text{C}$  で分解し、その塩酸塩は  $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{O}_4\text{N}_4\text{S}_3 \cdot \text{HCl}$  に相当する分子式をもち、Dragendorff 試薬に対する反応、ニトロプルシッド反応、チオクロム反応はいずれも陽性を示した。また、Kloeckera brevis のチアミン要求株および Streptococcus faecalis のリボ酸要求株を用いる生物検定法で、いずれも活性が認められた。また、 $2\text{C}^{14}$ -ピルビン酸と TPP とから酵母の Pyruvate oxidase を用いてヒドロキシエチルの部分に  $\text{C}^{14}$  を含む HET をつくり、これと  $\alpha$ -リボ酸とから前記の方法で新化合物を合成すると、強い放射能をもつ “Y” がえられる。このような事実から、新化合物は “X” のピロリン酸を含まない “Y” の構造をもつことが推測された。なお、赤外線スペクトルおよび紫外線スペクトル測定により、この化合物には第三級アルコールの CH 基の存在が認められ、また、リボ酸のジチオラン環が消失していることが判明した。さらに Ellman の方法で遊離 SH 基の存在することも証明された。これらの結果は “Y” の構造に強い支持を与えるものである。

つぎに、既知の方法に従ってブタの心筋および大腸菌からピルビン酸酸化酵素系を抽出し、これに Phosphotransacetylase と Lactic dehydrogenase とを組合わせて Dismutation 系をつくり、これを新化合物に作用させ、生成するアセチルリン酸をヒドロキサム酸として分析した。その結果、新化合物からは大量のアセチルリン酸が生成されることが証明された。しかし、HET を基質とした場合には、アセチルリン酸の生成はおこらなかった。この実験で  $\text{C}^{14}$ -HET および  $\text{C}^{14}$  を含む新化合物を用いた場合にも後者についてのみ放射性アセチルリン酸の生成が認められた。以上の結果から、申請者は、この酵素系でアセチル基の供与体となりうるものは HET のままではなく、これとリボ酸との結合した複合体であり、Ingraham らの推定した “X” の化学構造を有するものであると判定できるとしている。

#### 参 考 論 文

その 1 主論文の研究速報である。

その 2 オキシチアミンをチアミンと同様に利用することのできる酵母や大腸菌の変異株について、その活性を示す理由について研究したものである。

その 3 酵母に対するオキシチアミンの効果について詳しく研究したもので、オキシチアミンが、まず、オキシピリミジンとチアゾールとに分裂し、このチアゾールがチアミン合成に利用されることを明らか

にしたものである。

その4 チアミンを要求する大腸菌変異株について、オキシチアミンはアスパラギン酸と縮合したチアミンコハク酸を経てチアミンに変化することを明らかにした研究である。

その5 前報におけるチアミンコハク酸の単離に関する研究である。

その6 チアミンコハク酸の合成に関する研究である。

その7 酵母に対する S-ベンゾイルチアミンリン酸の遅効的活性が、脱ベンゾイルしてチアミンリン酸となるためであることを明らかにした研究である。

## 論文審査の結果の要旨

含水炭素や脂肪酸の中間代謝過程における  $\alpha$ -ケト酸の酸化的脱炭酸段階は、チアミンプロリン酸、リポ酸、CoA, FAD, NAD などの多数の補酵素を必要とする数多くの酵素からなる複合酵素系によって営まれていることが判明してきたが、基質の  $\alpha$ -ケト酸の脱炭酸によって生成した活性アルデヒドが、対応する活性アシル基に酸化される際の化学機構については、未解明のところが残されている。この段階において、 $\alpha$ -ケト酸がチアミンプロリン酸を補酵素とする酵素によって脱炭酸されて生ずる活性アルデヒドは、チアミンプロリン酸と結合したまま、さらにリポ酸と複合体をつくることが推定されていて、その化学構造も提示されているが、実験的証拠は未だあげられていない。

申請者は、ピルビン酸の分解過程で生成すると推定されるこの複合体を合成し、これの酵素的分解その他の実験結果から、これが中間体であることを証明した。すなわち、ヒドロキシエチルチアミンと  $\alpha$ -リポ酸との酸性アルコール溶液に紫外線（波長 2537 Å）を照射して、クロマトグラフィーなどによって原料の化合物やそれらの分解産物とは明らかに識別される新化合物の合成に成功した。この物質は分解点 192°C の白色粉末で、塩酸塩の元素組成は  $C_{22}H_{35}O_4N_4S_3HCl$  であり、*Kloekera bravis* のチアミン要求株および *Streptococcus faecalis* のリポ酸要求株に活性を示し、その赤外線スペクトルや紫外線スペクトルの測定結果や  $C^{14}$ -ヒドロキシエチルチアミンを用いるトレーサー実験などの結果をも総合して、この新化合物が前記の中間体と推定されている複合体からプロリン酸を除いた化学構造をもつことを明らかにした。

さらに、この新化合物は、ブタの心筋や大腸菌から抽出精製したピルビン酸酸化酵素系と Phosphotransacetylase および Lactic dehydrogenase とから組立てた Dismutation 系を作用させると、アセチルリン酸を生成することが確認された。すなわち、この結果は、新化合物が  $\alpha$ -ケト酸の酸化的脱炭酸過程における中間生成物であることを示す有力な証拠となるものである。

要するに、申請者の主論文は生体内における  $\alpha$ -ケト酸の分解過程での未解明部分をうずめるまことに価値ある研究である。

参考論文 7 編は、いずれもチアミンの誘導体の生物活性発現についての化学的研究であり、この方面における申請者の深い知識をうかがうことができる。

以上のように、申請者大石誠子の学位申請論文は、 $\alpha$ -ケト酸の生化学的分解過程の中間体の合成およ

びその酵素的分解について詳細な研究を行ない、重要な結論をえたものであって、生化学のこの分野での進歩に寄与するところが大きい。よって、本論文は理学博士の学位論文として価値があるものと認める。